

**PCT**  
 WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
 Internationales Büro  
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :  <b>G01N 33/53</b>	<b>A2</b>	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 99/50661</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 7. Oktober 1999 (07.10.99)		
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top; border-right: 1px solid black; padding: 5px;">           (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/00966             (22) Internationales Anmeldedatum: 29. März 1999 (29.03.99)             (30) Prioritätsdaten:                  198 14 088.6        30. März 1998 (30.03.98)        DE             (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):                  SCHEBO-TECH        MEDIZINISCH-BIOLOGISCHE                  FORSCHUNGSGESELLSCHAFT MBH [DE/DE]; Ne-                  tanyastrasse 3, D-35394 Giessen (DE).             (72) Erfinder; und            (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHEEFERS-BORCHEL,                  Ursula [DE/DE]; Krofdorfer Strasse 59, D-35435 Wet-                  tenberg (DE). LÜCKER, Ernst [DE/DE]; Tannenweg                  5, D-35440 Linden-Forst (DE). EIGENBRODT, Erich                  [DE/DE]; Erich-Kästner-Strasse 2, D-35440 Linden (DE).                  SCHEEFERS, Hans [DE/DE]; Krofdorfer Strasse 59,                  D-35435 Wettenberg (DE).             (74) Anwalt: FUCHS MEHLER WEISS &amp; FRITZSCHE; Brienner                  Strasse 52, D-80333 München (DE).         </td> <td style="width: 50%; padding: 5px;">           (81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,                  BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GE,                  GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,                  LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ,                  PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT,                  UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM,                  KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent                  (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches                  Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR,                  IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF,                  CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).   <b>Veröffentlicht</b>  <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu                  veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i> </td> </tr> </table>			(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/00966  (22) Internationales Anmeldedatum: 29. März 1999 (29.03.99)  (30) Prioritätsdaten: 198 14 088.6        30. März 1998 (30.03.98)        DE  (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SCHEBO-TECH        MEDIZINISCH-BIOLOGISCHE FORSCHUNGSGESELLSCHAFT MBH [DE/DE]; Ne- tanyastrasse 3, D-35394 Giessen (DE).  (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHEEFERS-BORCHEL, Ursula [DE/DE]; Krofdorfer Strasse 59, D-35435 Wet- tenberg (DE). LÜCKER, Ernst [DE/DE]; Tannenweg 5, D-35440 Linden-Forst (DE). EIGENBRODT, Erich [DE/DE]; Erich-Kästner-Strasse 2, D-35440 Linden (DE). SCHEEFERS, Hans [DE/DE]; Krofdorfer Strasse 59, D-35435 Wettenberg (DE).  (74) Anwalt: FUCHS MEHLER WEISS & FRITZSCHE; Brienner Strasse 52, D-80333 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu                  veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/00966  (22) Internationales Anmeldedatum: 29. März 1999 (29.03.99)  (30) Prioritätsdaten: 198 14 088.6        30. März 1998 (30.03.98)        DE  (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): SCHEBO-TECH        MEDIZINISCH-BIOLOGISCHE FORSCHUNGSGESELLSCHAFT MBH [DE/DE]; Ne- tanyastrasse 3, D-35394 Giessen (DE).  (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): SCHEEFERS-BORCHEL, Ursula [DE/DE]; Krofdorfer Strasse 59, D-35435 Wet- tenberg (DE). LÜCKER, Ernst [DE/DE]; Tannenweg 5, D-35440 Linden-Forst (DE). EIGENBRODT, Erich [DE/DE]; Erich-Kästner-Strasse 2, D-35440 Linden (DE). SCHEEFERS, Hans [DE/DE]; Krofdorfer Strasse 59, D-35435 Wettenberg (DE).  (74) Anwalt: FUCHS MEHLER WEISS & FRITZSCHE; Brienner Strasse 52, D-80333 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu                  veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>			
(54) Title: METHOD FOR DETECTING CENTRAL NERVOUS SYSTEM TISSUE (BRAIN, SPINAL CORD) IN PRODUCTS, ESPECIALLY IN HEATED MEAT PRODUCTS, AND A TEST KIT THEREFOR  (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON ZENTRALEM NERVENGeweBE (GEHIRN, RÜCKENMARK) IN ERZEUGNISSEN, INSBESONDERE IN ERHITZTEN FLEISCHERZEUGNISSEN, SOWIE EIN TESTKIT HIERZU  (57) Abstract  The invention relates to a method for the qualitative and quantitative detection of central nervous system tissue in products, especially in meat products, in which the presence of added brain and/or spinal cord is determined by the content of glial acidic protein (GFAP) in a test sample which is to be examined.  (57) Zusammenfassung  Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis von zentralem Nervengewebe in Erzeugnissen, insbesondere in Fleischerzeugnissen, bei dem man zugesetztes Gehirn und/oder Rückenmark durch den Gehalt an saurem Gliafaserprotein (GFAP) in einer zu untersuchenden Probe bestimmt.				

# **LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Verfahren zum Nachweis von zentralem Nervengewebe (Gehirn, Rückenmark) in Erzeugnissen, insbesondere in erhitzten Fleischerzeugnissen, sowie ein Testkit hierzu.

#### Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis von spezifiziertem Risikomaterial, insbesondere zentralem Nervengewebe in Erzeugnissen wie Lebensmitteln oder sonstigen Produkten und ein Testkit zur Durchführung des Verfahrens.

1985 wurde bei Rindern im Vereinigten Königreich eine neue, ausschließlich tödlich verlaufende Erkrankung des zentralen Nervengewebes, die bovine spongiforme Enzephalopathie (BSE), beschrieben. Die Entstehung der BSE wird heute auf die Verfütterung von nicht ausreichend erhitztem Tierkörpermehl von an Scrapie verendeten Schafen zurückgeführt. Nach dem Auftreten einer neuen Variante der Creutzfeld-Jakob-Erkrankung des Menschen (nvCJD) 1995 im Vereinigten Königreich und sich mehrender wissenschaftlicher Hinweise, besteht heute kein Zweifel mehr daran, das es sich bei der nvCJD um 'BSE des Menschen' handelt. Hierbei hat es sich gezeigt, daß der Erreger offenbar durch den Verzehr von Produkten, die von infizierten Tieren stammen, übertragbar ist. Da weiterhin gefunden wurde, daß die Übertragbarkeit an bestimmte Gewebe, insbesondere Hirn und Rückenmark gebunden ist, werden Gewebe, die eine nachweisbares Infektionspotential tragen, heute als „spezifiziertes Risikomaterial“ (SRM) bezeichnet. Dazu zählen auch Augen, Mandeln und Milz.

Rechtsvorschriften, wie die Entscheidung der Kommission 97/534/EG (Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften Nr. L 1997, 216: 95-98) sehen vor, daß bei allen in der Europäischen Union geschlachteten Rindern, Schafen und Ziegen derartig spezifiziertes, bei der Schlachtung anfallendes Material beschlagnahmt, vom Tierkörper entfernt, getrennt gesammelt, besonders gekennzeichnet und auch getrennt von den übrigen Konfiskaten beseitigt werden muß. Die daraus entstehenden Kosten werden allein in Deutschland mehr als eine Milliarde DM jährlich betragen. Begründet werden diese finanziell aufwendigen Maßnahmen mit der Notwendigkeit des vorbeugenden Verbraucherschutzes bei gleichzeitigem Fehlen eines geeigneten Tests für spezifiziertes Risikomaterial.

Da bei der Herstellung von Lebensmitteln, insbesondere von Fleischerzeugnissen wie Brühwürsten, das Zusetzen von Hirngewebe auch technologische Vorteile wie bessere Emulgierbarkeit (Brüh- und Kochwurstbrät) und erhöhte Stabilität (Beefburger) bietet, ist es darüber hinaus zum Schutze des Verbrauchers notwendig, die mißbräuchliche Verwendung von zentralem Nervengewebe, insbesondere von Rückenmark und Hirngewebe, im Rahmen der Lebensmittelüberwachung zu kontrollieren.

Bislang werden zur Kontrolle auf unerlaubte Zusätze bei Fleischerzeugnissen histologische Präparate (10 µm Kryoschnitte, Färbung: Picroindigocarmin/Karmalaun) angefertigt, die von besonders geschulten Fachleuten lichtmikroskopisch untersucht werden. Mit diesem Verfahren können neben

den zu erwartenden zulässigen Bestandteilen wie Muskulatur, Bindegewebe oder Gewürze, nicht zulässige Gewebe wie Niere, Pansen oder auch Haut identifiziert werden.

Es hat sich jedoch gezeigt, daß zentrales Nervengewebe in Fleischerzeugnissen mittels lebensmittel-histologischer Routinediagnostik nicht erfaßt werden kann. Weiterhin gilt dies auch für Ultradünnschnitte mit herkömmlicher Färbetechnik (Hämatoxylin/Eosin) sowie für Spezialfärbungen (Silberimprägnierung der Neurofibrillen, Markscheiden-, NISSL-Färbung). Auch sonstige charakteristische Bestandteile des zentralen Nervengewebes wie Hirnhäute oder Astrozyten sind mit Hilfe herkömmlicher Verfahren nicht identifizierbar. Offensichtlich werden diese Strukturen durch die bei der Herstellung von Fleischerzeugnissen verwendeten technologischen Verfahren (Homogenisierung, Erhitzung) weitgehend zerstört bzw. verändert und/oder maskiert.

Es besteht daher Bedarf an einem schnellen Testverfahren, mit dem der Zusatz an spezifiziertem Risikomaterial in Erzeugnissen auch noch in geringen Mengen nachgewiesen werden kann.

Vor kurzem ist im Hinblick auf die BSE ein solches Verfahren zum Nachweis von zentralem Nervengewebe in Fleischerzeugnissen beschrieben worden (E. Lücker und M. Bülte, Fleischwirtschaft 1997, 77: 836-840). Dabei wird mit einem enzymatisch-photometrischen Verfahren der Cholesteringehalt der Erzeugnisse bestimmt. Dabei ermöglicht die Erfassung der Erhöhung des Cholesteringehaltes durch zentrales Nervengewebe bei Brühwürsten den Nachweis von Zusätzen bereits ab 2% (statistische Sicherheit: 99,9%). Dieses Verfahren hat den Vorteil des geringen instrumentellen, Zeit- und Kostenaufwands. Es weist jedoch den Nachteil der geringen Spezifität auf. Interferenzen durch Zusätze an Ei, Eigelb, Leber oder Niere sowie 3- $\beta$ -Hydroxysterine können nicht ausgeschlossen werden. Es kann daher in der Praxis der Lebensmittelüberwachung als schnelles Screeningverfahren zur Identifizierung von Verdachtsproben dienen.

Schließlich sind neuronenspezifische Proteine bekannt, die z.T. nahezu ausschließlich im Bereich des zentralen Nervensystem lokalisiert sind. Hierzu zählt die neuronenspezifische Enolase: NSE (D. Schmechel et al., Science, 1978, 199: 313-315) sowie das saure Gliafaserprotein: 'glial acidic protein', GFAP (D. Dahl und A. Bignami, in: A. Laitha: Handbook of Neurochemistry, Plenum Press, New York, 1983: 127 - 151).

Es wurde gezeigt, daß der Nachweis von NSE mittels monoklonaler Antikörper in Fleischerzeugnissen die Erfassung von Zusätzen an zentralem Nervengewebe ab 1% mit absoluter Spezifität bei Brühwürsten ermöglicht (Zitat: in dem noch nicht veröffentlichten Deutschen Patent Nr. 198 04 216). Allerdings interferiert der hohe Fettgehalt der Fleischerzeugnisse bei der Detektion derart, daß die weitgehende Entfernung der Fettmatrix bei diesem Verfahren unerläßliche Voraussetzung ist. So konnten ohne Fettextraktion bei Kochwürsten mit hohem Fettgehalt auch erheblich Zusätze an Hirngewebe nicht nachgewiesen werden. Bei Brühwürsten wurde der Nachweis von Zusätzen an Hirngewebe unter 1% erst nach Fettextraktion möglich.

Die Erfindung hat damit zum Ziel, den weiterhin bestehenden Bedarf an einem spezifischen, leicht durchzuführenden Verfahren zu befriedigen, so daß insbesondere zentrales Nervengewebe noch bei

einem geringen Gehalt in Erzeugnissen ohne notwendige Fettextraktionsschritte zweifelsfrei nachgewiesen werden kann.

Diese Ziel wird nun mit dem erfindungsgemäßen Verfahren nach Anspruch 1 erreicht.

Es wurde nämlich gefunden, daß sich der Zusatz von zentralem Nervengewebe durch den Gehalt an GFAP nachweisen läßt, wobei der Gehalt direkt proportional zur zugesetzten Menge an zentralem Nervengewebe ist. Dies ist umso überraschender, weil umfangreiche Untersuchungen der Erfinder gezeigt haben, daß in erhitzten Fleischerzeugnissen wie Brüh- und Kochwürsten mit definierten Zusätzen an Gehirn bei der Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Isoelektrischer Fokussierung (PAGE) keine spezifischen Banden erhalten werden, die sich vom gleichen Produkt ohne Zusatz an Gehirn unterscheiden. Sowohl die Struktur als auch die physiko-chemischen Eigenschaften der ZNS-spezifischen Proteine werden offensichtlich infolge der erheblichen technologischen Einwirkungen (Homogenisierung sowie Erhitzung mindestens auf 80 °C über etw 60 Minuten) nachhaltig beeinträchtigt. Dies gilt auch für den Nachweis von derartigen charakteristischen Proteinen mittels immunologischer Methoden.

Erfindungsgemäß wurde nun gezeigt, daß sich trotz der oben beschriebenen Proteindenaturierung ein spezifischer Nachweis von zentralem Nervengewebe in Erzeugnissen bzw. Präparaten durchführen läßt. Dieser Nachweis läßt sich mit saurem Gliafaserprotein (GFAP) durchführen. Bislang diente das GFAP ausschließlich als Marker in nativen, nicht erhitzten Geweben oder Körperflüssigkeiten im Rahmen der Grundlagenforschung (wie histologisch-embryologische Untersuchungen) und der klinischen Tumordiagnostik.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß GFAP quantitativ auch bei intensiv homogenisierten und erhitzten Erzeugnissen wie Brühwürsten nachweisbar bleibt. Auch bei sehr starker Verdünnung des ZNS in Fleischerzeugnissen (0,25% Hirnzusatz) wird eine deutliche Reaktion erhalten.

Überraschenderweise wurde weiterhin festgestellt, daß der Nachweis auch ohne vorherige Fettextraktion sowohl bei Brüh- als auch bei Kochwürsten von Zusätzen an Hirngewebe unter 1% selektiv erfolgt.

Die Erfindung betrifft auch einen Testkitt zur Durchführung des Verfahrens. Dabei wird ein an GFAP spezifisch bindender Antikörper mittels bekannten Verfahren an eine Festphase immobilisiert. Die zu untersuchende Probe wird dann mit dem vorzugsweise gelösten Protein in Kontakt gebracht und in einem geeigneten Puffersystem mittels der Antikörper an die Festphase gebunden. Nach Waschen des so erhaltenen immobilisierten Antikörper-GFAP-Komplexes wird dann ein weiterer, mit einem Marker versehener sekundärer Antikörper zugesetzt, der an ein anderes Epitop des GFAP bindet und die Menge des Markers bestimmt. Die Menge an gebundenem Marker ist direkt proportional der Menge an GFAP in der Probe. Zweckmäßigerweise enthält der Testkit Referenzmaterial mit unterschiedlichen und bekannten Gehalten an zentralem Nervengewebe zu Sicherung der Analysenqualität.



Erfindungsgemäß ist es auch möglich, die Analytkonzentration mittels Biosensoren zu bestimmen, wie z. B. amperometrische Sensoren, potentiometrische, ionenselektive potentiometrische oder photometrische Sensoren oder auch solche mittels Halbleiterelektroden wie Feldeffekttransistoren (FET), chemosensitive Feldeffekttransistoren (CHEMFET), suspended-gate-Feldeffekttransistoren (SGFET) oder ionensensitiven Feldeffekttransistoren. Derartige Biosensoren sind zusammenfassend in E. A. H. Hall und G. Hummel in „Biosensoren“, Springer Verlag Heidelberg, Deutschland, 1995 beschrieben. Weitere Entwicklungen von ionensensitiven Feldeffekttransistoren (ISFET) oder optischen Detektoren sind unter anderem von F. Aberl und H. Wolf in „Aktuelle Trends in der Immunsensorik“, Labor 2000, S. 70-96 (1993) beschrieben. Ebenfalls geeignet ist das erfindungsgemäße Verfahren für die Durchführung mittels piezoelektrischen Schwingquarzen und Oberflächenwellenelementen, welche als Mikrowaagen verwendet werden können. Dabei wird der primäre Antikörper (der sog. Catcher) auf einem piezoelektrischen Substrat immobilisiert und nach Bindung mit dem zu analysierendem GFAP gemessen. Derartige Sensoren sind beispielsweise von A. Leidl et al. in „Proceedings of the Second International Symposium on Minaturized Total Analyses Systems  $\mu$ TAS“, Basel 1996, beschrieben. Quarzkristallmikrowaagen, wie sie von C. Köslinger et al., Fresenius J. Anal. Chem. (1994), 349: 349-354, beschrieben sind, haben sich als besonders geeignet erwiesen.

Die erfindungsgemäß zu verwendenden Antikörper sind auf an sich bekannte Weise erhältlich. Dabei werden zuerst Gliafaserproteine isoliert, wie beispielsweise bei M. Noppe et al. (In: H. Peeters (Hrsg.) *Protides of the Biological Fluids*, Pergamon Press, New York, 1979, 27: 813-816), bei Jeessen und Mirsky (*Journal of Neuroimmunology*, 1985, 8: 377-393) oder bei Eng und DeArmond (In: H. M. Zimmerman (Hrsg.) *Progress in Neuropathology*, Raven Press, New York, 1983, 5: 19-39) beschrieben ist. Danach wird ein Versuchstier mit dem so erhaltenen Gliafaserprotein bzw. mit solchen Bruchstücken davon, welche die entsprechenden Epitope aufweisen, immunisiert und die so gebildeten Antikörper isoliert.

Vorzugsweise werden jedoch nach der Methode von Köhler und Willstein erhältliche monoklonale Antikörper verwendet. Dabei werden beispielsweise BALB/C-Mäuse mit gereinigtem Gliafaserprotein (Debus, Weber et al., *Differentiation*, 1983, 25: 193-203) immunisiert und die Milzzellen dieser Tiere mit einer Myelomazelllinie, beispielsweise PA I, fusioniert. Die in den Ascites sezernierten Antikörper werden, beispielsweise im ELISA oder RIA, auf ihre Spezifität getestet und isoliert. Üblicherweise gehören die so erhaltenen Antikörper zur Klasse IgG1. Derart erhaltene Antikörper reagieren beispielsweise mit Astrocyten, mit Bergmann'schen Gliazellen und mit Tumoren der Neuroglia in Gefrier- und Paraffinschnitten. Derartige monoklonale Antikörper sind bereits im Handel erhältlich und werden beispielsweise von der Camon Laborservice GmbH, Wiesbaden, Deutschland (monoklonaler Antikörper E 008) und von Boehringer Mannheim GmbH, Deutschland (hergestellt aus den Maus-Maus Hybridklonen G-A-5) vertrieben.

**Beispiel 1:**

Es wurden Brühwürste mit definierten Zusätzen an Rindergehirn hergestellt, wie dies bei Lücker und Bülte (Fleischwirtschaft 1997, 77: 836-840) beschrieben ist. Bei diesen Brühwurststandards lag der Anteil an Hirnzusatz zwischen 1 und 33,3%. Zur Kontrolle wurde ein gleichartiger Brühwurststandard ohne Hirnzusatz sowie ein Brühwurststandard ohne Hirnzusatz jedoch mit Zusatz an 16% Eigelb verwendet (s. Tabelle). Die Proben wurden unter Kühlung im Tris-Harnstoffpuffer im Potter extrahiert (Extraktionspuffer: TRIS-Harnstoff-Puffer aus 20 mM Tris (Hydroxymethyl)-Aminomethan, 8 M Harnstoff, pH 7,6) und 15 Minuten bei 20.000 UpM zentrifugiert und zweifach filtriert. Das Filtrat wurde im Verhältnis 50:1 mit Probenpuffer (Tris-SDS-Mercaptoethanol-Harnstoff, Probenpuffer zu gleichen Teilen aus Sammelgelpuffer, 10%-igem Gew./Vol. 2 Mercaptoethanol, 10 %igem Gew./Vol. SDS und 8 M Harnstoff; Sammelgelpuffer: 0,5 Tris (Hydroxymethyl)-Aminomethan, 1% Gew./Vol. SDS) verdünnt. Diese Probenextrakte können bei -18 °C über mehrere Monate hindurch ohne Qualitätsverluste gelagert werden.

Die Proteinkonzentration der Extrakte wurde mit einem Proteintest von Bio-Rad (Richmond, USA) bestimmt. Die Proteine wurden mittels einer SDS-Gel-Elektrophorese mit 10%igen Acrylamidgelen nach Laemmli (Nature 1970, 227: 680-685) aufgetrennt. Dabei wurde bei jeder Probe 10 – 100 µg Protein aufgetragen. Nach der Auftrennung wurde z. T. mit Coomassie-Blau angefärbt. Als Marker diente der Molekularmasse-Kalibrierungskit LMW von Pharmacia (Uppsala, Schweden).

Die aufgetrennten extrahierten Proteine wurden dann im Elektroblobverfahren (CTI, Idstein/Taunus) auf Nitrocellulose-Membranen (Optitran BA-S85, Schleicher und Schuell) bzw. auf PVDF-Membranen (Immobilon-P, Millipore, Bedford, USA) übertragen und mittels primärer monoklonaler Antikörper in Verbindung mit sekundären Antikörpern markiert, die mit Peroxidase konjugiert waren (direkt bzw. biotyniliert). Als Substrat wurde 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochloridhydrat (DAB, Aldrich, Milwaukee, USA) verwendet.

Als Antikörper wurden kommerziell erhältliche, monoklonale, gegen humanes GFAP gerichtete Antikörper aus Maus-Maus-Hybridzellen des Klon MIG-G1 (CAMON, Wiesbaden) sowie G-5-A (Boehringer, Mannheim) verwendet.

Im Immunoblot sind bis zu 4 Banden im Bereich um 50 kD erkennbar (s. Fig. 1 A: Immunoblot von Brühwürsten mit 1 bis 33,3% Hirnzusatz, sowie Zusatz an Eigelb (16%) nach Fettextraktion, Anti-GFAP (Camon)). Die Ergebnisse für die spezifische Bande mit der höchsten Intensität sind der Tabelle 1 zu entnehmen.

**Beispiel 2:**

Beispiel 1 wurde mit den genannten Brühwurststandards wiederholt. Zusätzlich wurden Brühwurststandards mit 0, 0,25, 0,5, 1,0 und 2,0% Zusatz an Rinderhirn sowie Kochwurststandards mit Hirnzusätzen von 0 bis 32 % verwendet. Die Proben wurden wie unter Beispiel 1 direkt, unter

Zusatz von CHAPS (3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat 10 mM, Sigma, Deisenhofen) sowie nach Verminderung des Fettgehalts extrahiert. Zur Verminderung des Fettgehalts wurden die Proben manuell mit einem Messer fein zerkleinert. Davon wurden 10 g auf einem Faltenfilter (Nr. 597½, Schleicher und Schuell, Dassel) eingewogen, in eine Extraktionshülse aus Filterpapier (Nr. 603, Schleicher und Schuell, Dassel) eingebracht und mit Watte verschlossen. Die Extraktionshülse mit Probe wurde darauf in einem Extraktionsapparat nach Soxhlet mit Petroleum-Benzin (1,5-fache des Volumens des Extraktionsaufsatzes) acht Stunden unter Rückfluß extrahiert. Nach Rückdestillierung des Lösungsmittels wurden die Extraktionshülsen entnommen und bei Raumtemperatur 1 Stunde getrocknet. Die Reduktion des Fettgehaltes der so behandelten Proben lag bezogen auf den ursprünglichen Fettgehalt der Probe zwischen 18 und 53%. Die Ergebnisse sind in der Fig. 1 B (Immunoblot von Brüh- und Kochwürsten mit 0,25 bis 2,0% Hirnzusatz nach unterschiedlichen Extraktionen, Anti-GFAP (Boehringer)) und der Tabelle 1 zusammengestellt.

Tabelle 1. Auflistung der Ergebnisse (semiquantitativ) aus Beispiel 1 (ohne Fettextraktion) und Beispiel 2 (mit Fettextraktion) für die spezifische GFAP-Bande mit hoher Intensität.

Probe	Hirn-Zusatz (%)	Sonst. Zusatz (%)	Extraktion	Response <sup>1</sup>
Brühwurst	0	Ohne	Ohne Fettextraktion	-
	1			++
	2			++
	3,8			+++
	7,4			+++
	13,8			+++
	33,3			+++
	0	Eigelb, 16%	-	
	0	Ohne	Mit Fettextraktion	-
	0,25			+
	0,5			+
	1			++
2	++			
Kochwurst	0	Leber, 16% bzw. Leber, 32%	Ohne Fettextraktion	-
	1			++
	2			++
	4			+++
	8			+++
	16			+++
	32			+++
	0,25		Mit Fettextraktion	+
	0,5			+
	1			+
	2			++
	4			+++

- <sup>1</sup>
- Bande nicht erkennbar
  - + Bande (mit bloßem Auge) erkennbar
  - ++ Bande gut erkennbar
  - +++ Bande sehr stark ausgeprägt\*

\* Einschließlich noch stärker ausgeprägten Banden: diese werden hier nicht quantifiziert.



## Patentansprüche

1. Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis von zentralem Nervengewebe in Erzeugnissen, insbesondere in erhitzten Fleischerzeugnissen, dadurch gekennzeichnet, daß man zugesetztes Gehirn oder Rückenmark durch den Gehalt an saurem Gliafaserprotein (glial acidic protein, GFAP) und Bruchstücken davon in einer zu untersuchenden Probe erfaßt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß man den Gehalt an GFAP mittels anti-GFAP-Antikörpern erfaßt.
3. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist, der aus der Hybridoma-Zelllinie MIG-G2 und/oder G-A-5 erhältlich ist.
4. Testkit zum Nachweis von Zusätzen an zentralem Nervengewebe in Erzeugnissen, insbesondere in erhitzten Fleischerzeugnissen, dadurch gekennzeichnet, daß er Antikörper gegen GFAP enthält.
5. Testkit nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist, erhältlich aus der Hybridoma-Zelllinie MIG-G2 (Camon, Wiesbaden), G-A-5 (Boehringer, Mannheim) ist.
6. Testkit nach einem der Ansprüche 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß er einen markierten Antikörper enthält.
7. Testkit nach einem der Ansprüche 4 - 6, dadurch gekennzeichnet, daß er einen an der Festphase gebundenen anti-GFAP-Antikörper enthält.
8. Testkit nach einem der Ansprüche 4 - 7, dadurch gekennzeichnet, daß er einen ELISA-, Schwingquarz- oder Mikrowaagetest enthält.
9. Testkit nach einem der Ansprüche 4 - 8, dadurch gekennzeichnet, daß er für die analytische Qualitätssicherung Referenzmaterial mit bekannten Gehalten an zentralem Nervengewebe enthält.

...

Fig. 1 A

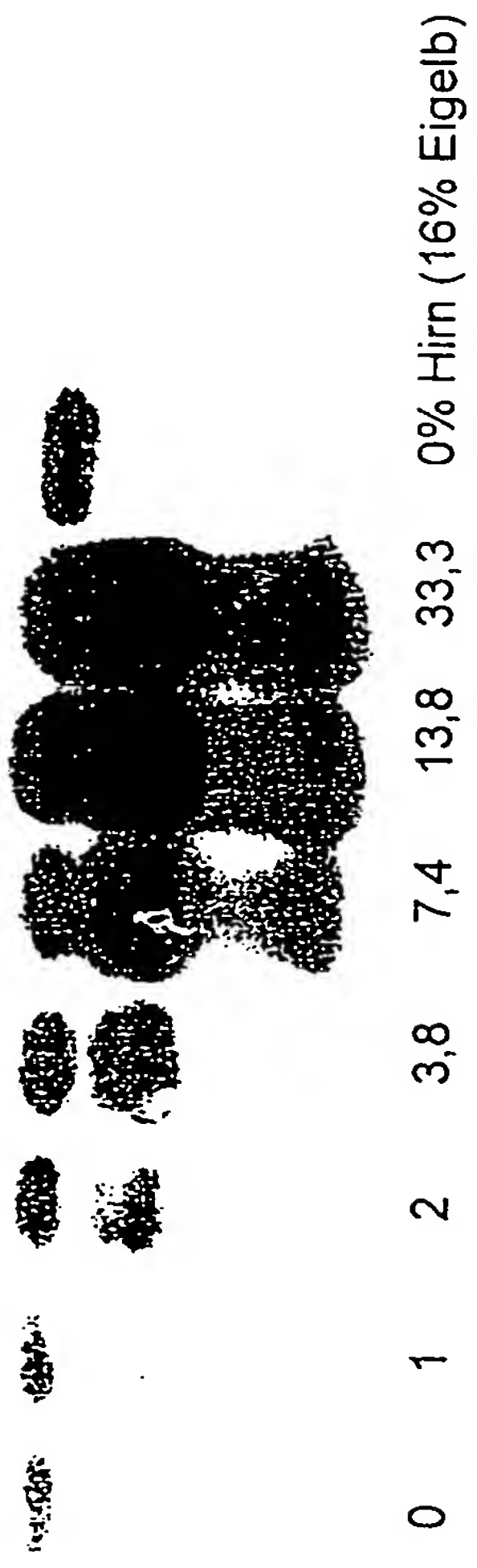


Fig. 1 B

